

Las anhidrasas carbónicas y su participación diferencial en la movilidad de espermatozoides de humano y ratón

Omar José Ramírez, Paulina Torres Rodríguez y Claudia L. Treviño

Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México
Cuernavaca, Mor.; México
omarjoserz@gmail.com

Abstract - Fertilization is a crucial event where sperm and egg fuse to generate a new individual. In this process, the proper regulation of certain parameters such as intracellular pH is crucial. Carbonic anhydrases (CAs) are among the molecular entities that control intracellular pH dynamics in most cells. Unfortunately, little is known about the function of CAs in mammalian sperm physiology. Recently, we re-explored the expression of CAI, II, IV and XIII in human and mouse sperm, and found that the level of CA catalytic activity is similar in non-capacitated and capacitated mouse sperm. In this work, using the general CA inhibitor ethoxzolamide, we studied in both species how CAs participate in motility. We found that capacitated human sperm depend strongly on CAs activity to support normal motility, while capacitated mouse sperm do not.

Keywords- sperm, carbonic anhydrase, motility, pH regulation

Resumen – La fecundación es un evento crucial en el que el espermatozoide y el óvulo se fusionan para generar un nuevo individuo. En este proceso es crucial mantener una regulación apropiada de ciertos parámetros como el pH intracelular. Las anhidrasas carbónicas (CAs) son algunas de las entidades moleculares que controlan la dinámica intracelular del pH en la mayoría de las células. Desafortunadamente, se sabe muy poco acerca de la función de las CAs en la fisiología de los espermatozoides de mamífero. Recientemente, reexploramos la expresión de las CAI, II, IV y XIII en espermatozoides de humano y ratón, y encontramos que el nivel de actividad catalítica de las CAs es de magnitud similar en los espermatozoides no capacitados y capacitados de ratón. En este trabajo, usando el inhibidor general de CAs etoxizolamida, estudiamos en ambas especies cómo las CAs participan en uno de los procesos fisiológicos fundamentales del espermatozoide, como es la movilidad. Descubrimos que los espermatozoides capacitados de humano dependen fuertemente de la actividad de las CAs para mantener la movilidad, mientras que no es el caso para los espermatozoides capacitados de ratón.

Palabras claves- espermatozoide, anhidrasa carbónica, movilidad, regulación de pH

I. INTRODUCCIÓN

La fecundación es un proceso biológico fundamental que produce un individuo nuevo y único, permitiendo la preservación de las especies y la evolución mediante la reproducción sexual. La interacción y el diálogo molecular establecidos entre los gametos masculinos y femeninos se encuentran bajo intenso estudio. Los espermatozoides están singularmente equipados para alcanzar, reconocer y fusionarse con el óvulo. Los espermatozoides son las únicas células que desarrollan su función fuera del organismo del que provienen y deben estar preparados para enfrentar un entorno en constante cambio y sobrellevar varias barreras físicas. Dado que básicamente son células transcripcional y traduccionalmente silenciosas, los espermatozoides dependen críticamente de diversos mecanismos de señalización para nadar de manera dirigida, y para ajustarse a condiciones ambientales desafiantes. Después de la diferenciación celular en el testículo, los espermatozoides continúan madurando conforme se desplazan a través del epidídimo. Este tránsito va acompañado de una

exposición a cambios significativos en la osmolaridad, la temperatura, el pH extracelular (pH_e) y en las concentraciones de varios iones. Tales cambios juegan un papel importante en su fisiología. Por ejemplo, después de la eyaculación el espermatozoide encuentra bajas concentraciones de K^+ extracelular y altas de HCO_3^- y Na^+ (2). Los cambios concomitantes en la concentración intracelular de HCO_3^- ($[\text{HCO}_3^-]_i$) y Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) que experimenta el espermatozoide al exponerse a tales condiciones, activan a su vez a la adenilato ciclasa soluble (ACs), ocasionando un aumento en la frecuencia del batido flagelar al activar una vía de señalización mediada por PKA (3)(4). Por lo tanto, la ACs es una probable conexión entre las anhidrasas carbónicas (i. e., CAs; metaloenzimas que convierten el CO_2 en HCO_3^- y viceversa) y los pasos río abajo en las vías de señalización celular de los espermatozoides. Los espermatozoides se encuentran inmóviles dentro del epidídimo, en parte debido a las condiciones ácidas del fluido extracelular. Durante la eyaculación, los espermatozoides se mezclan con el fluido seminal que tiene un pH alcalino (7.2-8.4) y una alta $[\text{HCO}_3^-]$. Los iones HCO_3^- no sólo contribuyen a mantener la movilidad de los espermatozoides, sino que también los protegen en el ambiente ácido de la vagina. A pesar de que el papel del HCO_3^- durante la reacción acrosomal aún no está bien establecido, ahora es claro que la regulación de la actividad del espermatozoide está fuertemente relacionada con los niveles de $[\text{HCO}_3^-]_i$ y los valores de pH_i . Sin embargo, la identidad y la interacción de las entidades moleculares que participan en su modulación están lejos de ser claras. Por ejemplo, a pesar de la gran importancia de las CAs en la regulación del pH en prácticamente todos los tipos celulares, poco se sabe sobre su distribución subcelular y su papel en la fisiología de los espermatozoides. Las CAs están presentes en los tres dominios de los seres vivos y están codificadas por seis familias de genes llamadas: α , β , γ , δ , ζ y η (5)(6). Los mamíferos solo expresan α -CAs y tienen distinta distribución celular y tisular, propiedades cinéticas y sensibilidad a los inhibidores (7). Usando distintas técnicas bioquímicas, se ha demostrado que las isoformas CAI (8), CAII (8)(9) y CAXIII (10) están presentes en los espermatozoides de humano, mientras que las isoformas CAII (11), CAIV (12)(13)(3) y CAXII (14) se encuentran en los espermatozoides de ratón. Interesantemente, también se ha demostrado que la isoforma CAIV se transfiere a la membrana plasmática de los espermatozoides no capacitados de ratón durante su paso a través del epidídimo, y que los espermatozoides no capacitados tanto de humano como de ratón responden a incrementos extracelulares de CO_2 , con un aumento en la frecuencia del batido flagelar, efecto que se puede bloquear por el inhibidor general de CAs, etoxizolamida (EZA) (3). Además, los espermatozoides no capacitados de ratones CAIV^{-/-} mostraron una disminución en la actividad total de las CAs y una reducción en la respuesta a CO_2 en comparación con los espermatozoides de ratones silvestres (3). Otro estudio propuso que el consumo de glucosa y la regulación de la frecuencia del batido flagelar en espermatozoides de ratón están conectadas a través de la generación de HCO_3^- a partir del CO_2 , reacción que es mediada por la acción de las CAs (15). Recientemente, nosotros comprobamos la presencia de las anhidrasas CAI, CAII y CAXIII en espermatozoides de humano y CAII, CAIV CAXIII en espermatozoides de ratón. Debido a que en los últimos años se han descubierto varias diferencias fisiológicas importantes entre los espermatozoides de humano y ratón (2)(7), y considerando la escasez de estudios de las CAs en los espermatozoides, en este trabajo nos dimos a la tarea de comparar el papel que las CAs tienen en la movilidad de espermatozoides capacitados de ratón y humano, en presencia y ausencia del inhibidor general de CAs.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de espermatozoides de humano y ratón. Los espermatozoides de ratón se obtuvieron de adultos machos de aproximadamente tres meses de edad, cepas CD1 o C57BL/6J. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los espermatozoides móviles se obtuvieron de caudas del epidídimo en medio Whitten's pH 7.4 usando la técnica de swim-up (16). El medio Whitten's contiene (en mM): NaCl 100, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, glucosa 5.5, piruvato de sodio 1, L-Lactato de

Sodio 4.8, HEPES 20, NaHCO_3 24 y CaCl_2 2. Por otro lado, los eyaculados de humano se obtuvieron de donadores sanos después de 48 horas de abstinencia sexual. Sólo se utilizaron muestras que cumplieron con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (17). Las muestras de semen se dejaron licuar a 37°C y después los espermatozoides móviles se recuperaron en medio Ham's F-10 pH 7.4 (+ CaCl_2 2 mM) usando también la técnica de swim-up (18). Para obtener espermatozoides capacitados, los espermatozoides de humano y ratón se incubaron en sus respectivos medios, suplementados con albúmina sérica bovina 5 mg/mL. Después los espermatozoides de humano y ratón se ajustaron a una concentración de 1×10^7 células/mL y se incubaron a 37°C con CO_2 5%/Aire 95% durante al menos 4 horas o 40 minutos, respectivamente. Antes de cada experimento, las células capacitadas de humano se centrifugaron durante 5 minutos a $735 \times g$ y se resuspendieron en solución fisiológica pH 7.4, la cual contiene (en mM): NaCl 94, KCl 4, CaCl_2 2, MgCl_2 1, piruvato de sodio 1, NaHCO_3 25, glucosa 5, HEPES 30 y L-Lactato de Sodio 10.

Ensayos de movilidad. La movilidad de los espermatozoides capacitados de humano y ratón se midió en un Sperm Class Analyzer (SCA Microptic, Barcelona, España). Alícuotas de 1×10^7 células/mL se incubaron durante 30 minutos a 37°C con CO_2 5%/Aire 95% con el vehículo (DMSO) o con distintas concentraciones del inhibidor general de CAs, etoxizolamida (EZA). 10 μL de células de cada muestra se colocaron dentro de una cámara MicroCell (para células de ratón) o entre un cubreobjetos y un portaobjetos (para células de humano). A continuación se describe cómo opera el sistema automatizado para medir la movilidad espermática. El equipo consta de una cámara de video acoplada a un microscopio y a una computadora. Esta última contiene un programa de rastreo de células (19). En este equipo el análisis del movimiento de los espermatozoides comienza cuando se digitaliza la imagen de las células obtenida mediante el microscopio y la cámara. La computadora determina el número de píxeles que cubren la cabeza de cada célula. Dependiendo de la especie, hay un número mínimo y máximo de píxeles que es aceptable para la cabeza de un espermatozoide, por lo que la computadora reconoce como espermatozoide a todo aquel objeto cuyo número de píxeles está en ese intervalo. Después de que se han identificado y grabado las posiciones (x,y) de las cabezas de todos los espermatozoides en un marco, se analiza la posición de las mismas células en el siguiente marco. Entonces la computadora busca la imagen de la cabeza de un espermatozoide entre dos marcos consecutivos, dentro de una zona de probabilidad, la cual es un círculo de un radio particular alrededor de la cabeza. Este radio se determina por la distancia máxima que se esperaría que un espermatozoide cubra en el periodo de tiempo que hay entre los dos marcos. Después de que la imagen secuencial de la cabeza de un espermatozoide se ha identificado y se han localizado sus coordenadas (x,y), se analiza el siguiente marco y así sucesivamente hasta que el periodo de tiempo se termina. Una vez que se tienen las trayectorias de los espermatozoides, se pueden calcular los valores numéricos para los parámetros de movimiento.

Los valores cinemáticos determinados para cada espermatozoide cubren la velocidad del movimiento, el ancho de la trayectoria de la cabeza y la frecuencia de cambio en la dirección de la cabeza (19). Los valores de velocidad que se pueden determinar en un espermatozoide son la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad de línea recta (VSL) y la velocidad promedio de la trayectoria (VAP). Todos estos valores se expresan en micrómetros por segundo. La VCL se refiere a la distancia total que la cabeza del espermatozoide cubre durante el periodo de observación y siempre es el valor más alto de los tres tipos de velocidad. La VSL se determina a partir de la distancia en línea recta entre el primer y último punto de la trayectoria y expresa la distancia neta de espacio durante el periodo de observación. Este siempre es el valor más bajo de las tres velocidades. La VAP es la distancia promedio que un espermatozoide ha viajado en la dirección promedio de movimiento durante el periodo de observación. Debido a que la forma de la trayectoria influye los valores de velocidad, los valores de velocidad también se comparan y a partir de esto se derivan más parámetros de movimiento. La relación de las

tres velocidades son la linealidad (LIN), la rectitud (STR) y el índice de oscilación (WOB) y se derivan como se muestra a continuación:

$$\begin{aligned} \text{LIN} &= (\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100 \\ \text{STR} &= (\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100 \\ \text{WOB} &= (\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100 \end{aligned}$$

Estos tres valores se expresan como porcentajes. La amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) es el ancho del movimiento lateral de la cabeza del espermatozoide; se calcula como el ancho total de la trayectoria de la cabeza y se expresa en micrómetros. Por último, la frecuencia del batido flagelar (BCF) es el número de veces que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección del movimiento y se expresa en Hertz (19).

Análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos se hicieron con el freeware KyPlot 2.0 (Tokyo, Japón), y los valores estadísticos se muestran como promedio \pm error estándar del promedio (S. E. M.). Se hicieron pruebas *t* de Student para calcular las diferencias significativas entre condiciones, y se representan en las figuras y en la tabla como: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La movilidad de los espermatozoides de humano depende en gran medida de la actividad de las CAs. En los espermatozoides de mamífero la movilidad se modula por diferentes factores como el pH_i (7). Previamente se demostró que los inhibidores generales de CAs, como la EZA y la acetazolamida, disminuyen la frecuencia del batido flagelar (BCF) de forma dosis-dependiente en espermatozoides no capacitados de ratón (3). En este estudio exploramos la posible participación de CAs en la movilidad de los espermatozoides capacitados de ratón y humano, analizando siete diferentes parámetros de movilidad, además de la BCF. En la **Figura 1** se puede observar que los ocho parámetros se vieron afectados por la EZA de forma dosis-dependiente en los espermatozoides capacitados de humano, y los cambios observados fueron estadísticamente distintos a partir de EZA 10 nM.

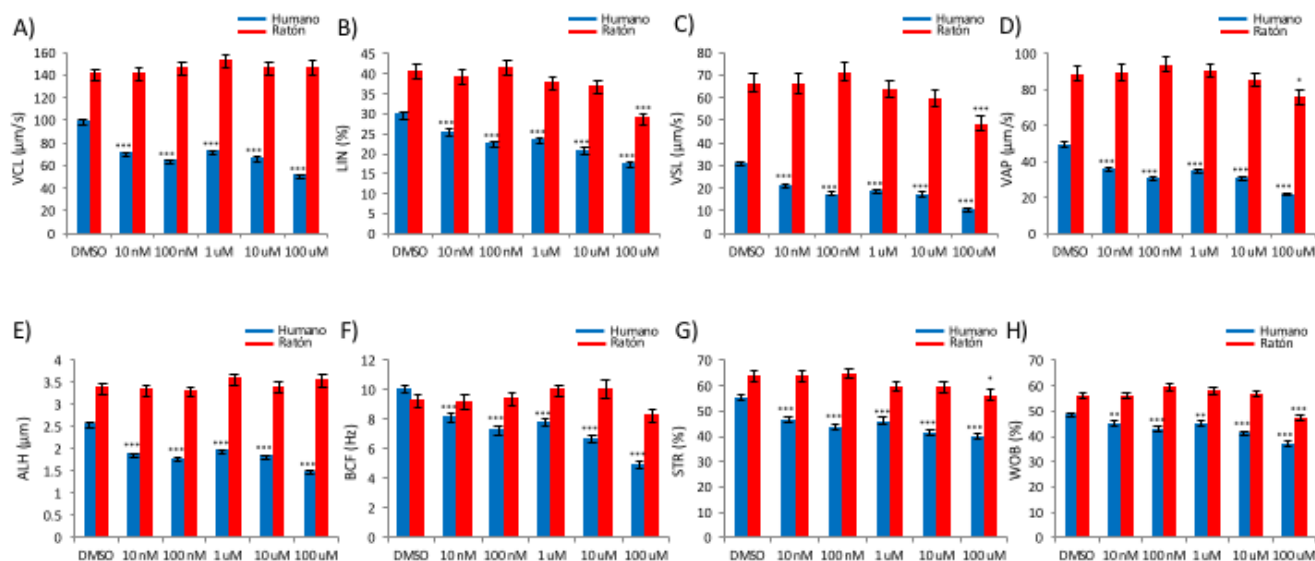


Figura 1. La EZA afecta diferencialmente la movilidad en los espermatozoides capacitados de humano y ratón.

Interesantemente y en contraste con los resultados reportados previamente para los espermatozoides no capacitados de ratón, de entre los ocho parámetros de movilidad analizados en los espermatozoides capacitados de ratón, cinco de ellos disminuyeron significativamente solamente a EZA 100 µM (Tabla 1). Todos estos resultados demuestran que las CAs juegan un papel muy importante en la regulación de la movilidad de los espermatozoides capacitados de humano, y a pesar de que demostramos que las CAs se encuentran activas en los espermatozoides capacitados de ratón, al parecer no tiene un papel importante en la regulación de la movilidad (al menos bajo nuestras condiciones experimentales). Estos resultados en los espermatozoides capacitados de ratón fueron inesperados, si se considera que se reportó previamente que la inhibición de las CAs en los espermatozoides no capacitados de ratón altera al menos a la BCF (3). La diferencia en los resultados obtenidos en los espermatozoides de ratón podría estar ocasionada por los distintos estados fisiológicos de las células (i. e., no capacitadas *versus* capacitadas), pero también podría estar ocasionada por las diferencias en la composición de los medios utilizados (e. g., la concentración de piruvato es cinco veces más alta en el medio usado en este trabajo).

Tabla I. Valores promedio de los parámetros de movilidad en los espermatozoides capacitados de humano y ratón.

Parámetro de movilidad	Espermatozoides capacitados de humano		Espermatozoides capacitados de ratón	
	DMSO	EZA 100 μ M	DMSO	EZA 100 μ M
VCL	98.65 \pm 2.34 μ m/s	50.78 \pm 1.58 μ m/s***	140.19 \pm 4.96 μ m/s	145.85 \pm 6.30 μ m/s
VSL	30.84 \pm 1.03 μ m/s	10.55 \pm 0.61 μ m/s***	66.63 \pm 3.98 μ m/s	48.61 \pm 3.25 μ m/s***
VAP	49.67 \pm 1.24 μ m/s	21.69 \pm 0.84 μ m/s***	88.85 \pm 4.11 μ m/s	75.81 \pm 3.77 μ m/s*
LIN	29.51 \pm 0.84%	17.24 \pm 0.75%***	40.53 \pm 1.78 %	28.65 \pm 1.39%***
STR	55.40 \pm 1.15%	40.09 \pm 1.31%***	63.78 \pm 2.14%	56.33 \pm 2.06%*
WOB	48.46 \pm 0.76%	37.21 \pm 0.92%***	55.90 \pm 1.13%	47.43 \pm 1.30%***
ALH	2.52 \pm 0.05 μ m	1.46 \pm 0.04 μ m***	3.35 \pm 0.11 μ m	3.52 \pm 0.14 μ m
BCF	10.03 \pm 0.27 Hz	4.90 \pm 0.23 Hz***	9.25 \pm 0.43 Hz	8.23 \pm 0.44 Hz

La regulación del pH_i es crucial para la sobrevivencia de todas las células. Como se mencionó en la *Introducción*, la actividad de las CAs es muy importante en la regulación del pH_i y el espermatozoide no es la excepción, sin embargo los estudios respecto a este tema aún son incipientes, por lo que será fundamental en los próximos años investigar con mayor profundidad cómo es esta regulación y cómo interaccionan las CAs con otros elementos moleculares fundamentales del espermatozoide de mamífero. También es importante mencionar que las CAs pueden formar metabolones (i. e., complejos de enzimas físicamente cercanas entre sí que catalizan reacciones en una vía metabólica) con diferentes intercambiadores aniónicos (20), lo que hace aún más complejo el efecto de estas enzimas en la fisiología de los espermatozoides de mamífero.

A pesar de que con frecuencia los espermatozoides de ratón se usan como modelo experimental y la información obtenida se extrapola a la fisiología de los espermatozoides de humano, nuestros resultados resaltan la importancia de usar ambas especies como modelos experimentales. De hecho, ya se han reportado previamente diferencias fisiológicas entre ambas especies, además de las descritas en este trabajo. Entre tales diferencias se encuentran las diferencias funcionales de ciertos canales iónicos y transportadores (2)(7).

Finalmente, considerando que las CAs juegan un papel importante en la fisiología de los espermatozoides de mamífero, será interesante realizar estudios posteriores para investigar la presencia de otras isoformas de la familia alfa en los espermatozoides, probar inhibidores específicos para dichas isoformas y estudiar el papel que estas juegan en la fisiología de los gametos masculinos usando ratones knockout.

IV. REFERENCIAS

- [1] José O, Torres-Rodríguez P, Forero-Quintero LS. Biochemical and Biophysical Research Communications Carbonic anhydrases and their functional differences in human and mouse sperm physiology. 2015;468:713–8.
- [2] Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Trevino CL. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiological Reviews*. 2011. p. 1305–55.
- [3] Wandernoth PM, Raubuch M, Mannowetz N, Becker HM, Deitmer JW, Sly WS, et al. Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. *PLoS One*. 2010 Jan;5(11):e15061.
- [4] Mannowetz N, Wandernoth PM, Wennemuth G. Glucose is a pH-Dependent Motor for Sperm Beat Frequency during Early Activation. 2012;7(7).

- [5] Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(2):168–81.
- [6] Del Prete S, Vullo D, Fisher GM, Andrews KT, Poulsen S-A, Capasso C, et al. Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*--the η -carbonic anhydrases. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;24(18):4389–96. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X14008464>
- [7] Nishigaki T, José O, González-cota AL, Romero F, Treviño CL, Darszon A. Biochemical and Biophysical Research Communications Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;450(3):1149–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.100>
- [8] Ali Akbar S, Nicolaidis KH, Brown PR. Carbonic anhydrase isoenzymes CAI and CAII in semen, decidua, chorionic villi and various fetal tissues. *Early Hum Dev.* 1998;51:205–11.
- [9] Parkkila S, Kaunisto K, Kellokumpu S, Rajaniemi H. A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa. *Histochemistry.* 1991;95:477–82.
- [10] Lehtonen J, Shen B, Vihinen M, Casini A, Scozzafava A, Supuran CT, et al. Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J Biol Chem.* 2004 Jan;279(4):2719–27.
- [11] Mezquita P, Mezquita C, Mezquita J. Novel transcripts of carbonic anhydrase II in mouse and human testis. *Mol Hum Reprod.* 1999;5:199–205.
- [12] Ekstedt E, Holm L, Ridderstråle Y. Carbonic anhydrase in mouse testis and epididymis; transfer of isozyme IV to spermatozoa during passage. *J Mol Histol.* 2004;35:167–73.
- [13] Sleight SB, Miranda P V, Plaskett N-W, Maier B, Lysiak J, Scrabble H, et al. Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biol Reprod.* 2005 Oct;73(4):721–9.
- [14] Halmi P, Lehtonen J, Waheed A, Sly WS, Parkkila S. Expression of hypoxia-inducible, membrane-bound carbonic anhydrase isozyme XII in mouse tissues. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;277:171–7.
- [15] Mannowetz N, Wandernoth PM, Wennemuth G. Glucose is a pH-dependent motor for sperm beat frequency during early activation. *PLoS One.* 2012;7(7).
- [16] Navarrete FA, García-Vázquez FA, Alvau A, Escoffier J, Krapf D, Sánchez-Cárdenas C, et al. Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways. *J Cell Physiol.* 2015;230(8):1758–69.
- [17] WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva, Switzerland; 2010. 271 p.
- [18] Mata-Martínez E, José O, Torres-Rodríguez P, Solís-López A, Sánchez-Tusie A a, Sánchez-Guevara Y, et al. Measuring Intracellular Ca²⁺ Changes in Human Sperm using Four Techniques: Conventional Fluorometry, Stopped Flow Fluorometry, Flow Cytometry and Single Cell Imaging. *J Vis Exp* [Internet]. 2013;(75):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23728309>
- [19] Mortimer ST. CASA — Practical aspects. *J Androl.* 2000;
- [20] Becker HM, Klier M, Deitmer JW. Carbonic anhydrase: Mechanism, regulation, links to disease, and industrial applications. In 2014. p. 105–34.